



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS DIADEMA



KAROLINE FERREIRA DA CUNHA

Investigação de metilxantinas em amostra comercial de
Marapuama (*Ptychopetalum olacoides*) em pó.

DIADEMA

2019

KAROLINE FERREIRA DA CUNHA

Investigação de metilxantinas em amostra comercial de
Marapuama (*Ptychopetalum olacoides*) em pó.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
exigência parcial para obtenção do título de Bacharel
em Farmácia, ao Instituto de Ciências Ambientais,
Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de
São Paulo-*campus* Diadema

Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Leite de Moraes
Orientadora

DIADEMA

2019

Cunha, Karoline Ferreira da

Investigação de metilxantinas em amostra comercial de Marapuama(*Ptychopetalum olacoides*) em pó. / Karoline Ferreira da Cunha – – Diadema, 2019.
46 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)
Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2019.

Orientador: Maria de Lourdes Leite de Moraes

1.Marapuama.2. Eletroforese Capilar. 3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. I. Investigação de metilxantinas em amostra comercial de Marapuama (*Ptychopetalum olacoides*) em pó.

CDD 583.88

Karoline Ferreira da Cunha

**INVESTIGAÇÃO DE METILXANTINAS EM AMOSTRA COMERCIAL
DE MARAPUAMA (*Ptychopetalum olacoides*) EM PÓ**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia, ao Instituto de Ciências
Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da
Universidade Federal de São Paulo –
campus Diadema.

Aprovado em: 26/11/2019

Nota: 9,53

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Leite de Moraes
Orientadora

Prof. Dr. Leandro Calixto

Prof. Dr. Luiz Elídio Gregório

Diadema
2019

AGRADECIMENTOS

A minha família, por todo apoio, paciência para que mais esta fase fosse concluída, me incentivando, dando coragem e força para que todos os obstáculos no meio do caminho pudessem ser ultrapassados.

A minha amiga Mayara Tavares, que esteve ao meu lado passando por muitos momentos de ansiedade e preocupações, que fez os momentos mais estressantes da graduação se tornarem mais leves compartilhando incontáveis momentos felizes. As minhas amigas Beatriz Furue e Thalita Krisllen, que sempre estiveram ao meu lado durante toda essa jornada, obrigada pelo carinho, por toda a ajuda e por suas amizades em todos esses anos.

A minha orientadora, Maria de Lourdes, pela paciência, incentivo, acolhimento e principalmente pela confiança em me orientar para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de São Paulo, em todo seu corpo docente e técnico, por garantirem o meu crescimento e aprendizado durante os mais de cinco anos em que estive em curso.

A estes dedico o meu trabalho, muitíssimo obrigada!

RESUMO

A *Ptychopetalum olacoides* Benth., Olacaceae, é uma pequena árvore ou arbusto, abundante na região amazônica, popularmente conhecida como Marapuama ou Muirapuama. A planta é popularmente indicada para vários usos medicinais, sendo o principal o tratamento da impotência sexual. A parte utilizada da planta é a casca das raízes, podendo também ser encontrada na forma de pó ou cápsulas. Outros usos são como afrodisíaco, para reumatismo, gripe, anti-inflamatório natural e problemas neuromusculares. Sua composição química é bastante complexa. Estudos realizados com as cascas de Marapuama mostraram a presença de ácidos graxos, esteróides e metilxantinas. As metilxantinas apresentam ação estimulante sobre o sistema nervoso central, aumentando a frequência cardíaca, podendo estar envolvidas na atividade biológica. No presente trabalho foi investigada a presença de metilxantinas em extrato bruto de Marapuama, utilizando duas técnicas de separação: a Eletroforese Capilar (CE) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Foi empregado um protocolo em CE no modo MECK para análise de metilxantinas, onde foram otimizados o tipo de eletrólito, pH, comprimento de onda de detecção e voltagem. A separação em HPLC também foi otimizada para a fase móvel, fluxo, comprimento de onda e coluna. A identificação das metilxantinas foi feita através da comparação do tempo de migração e retenção com padrões analíticos, da comparação dos espectros de ultravioleta e da adição de padrão. Foram quantificados por eletroforese capilar a cafeína (43,56 mg/L), teobromina (27,46 mg/L) e teofilina (38,81 mg/L). Esta é a primeira vez que a CE é usada para a análise de Marapuama. O uso do protocolo em CE permitiu a investigação dos metabólitos secundários no extrato bruto com alta especificidade e em curto tempo de análise, sem a necessidade de um tratamento prévio da amostra.

Palavras-chave: *Ptychopetalum olacoides*, Marapuama, Eletroforese Capilar, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Metilxantinas.

ABSTRACT

Ptychopetalum olacoides Benth., Olacaceae, is a small tree or shrub, abundant in the Amazon region, popularly known as Marapuama or Muirapuama. The plant is popularly indicated for various medicinal uses, the main one being the treatment of sexual impotence. The used part of the plant is the root bark and can also be found in powder or capsule form. Other uses are as aphrodisiac, for rheumatism, flu, natural anti-inflammatory and neuromuscular problems. Its chemical composition is quite complex. Studies carried out with Marapuama peels showed the presence of fatty acids, steroids and methylxanthines. Methylxanthines have a stimulating action on the central nervous system, increasing heart rate and may be involved in biological activity. The present work investigated the presence of methylxanthines in crude Marapuama extract using two separation techniques: Capillary Electrophoresis (CE) and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). A MECK mode EC protocol was used for methylxanthine analysis, where the electrolyte type, pH, detection wavelength and voltage were optimized. HPLC separation has also been optimized for mobile phase, flow, wavelength and column. Methylxanthines were identified by comparing migration and retention time with analytical standards, comparing ultraviolet spectra and standard addition. Caffeine (43.56 mg / L), theobromine (27.46 mg / L) and theophylline (38.81 mg / L) were quantified by capillary electrophoresis. This is the first time EC has been used for Marapuama analysis. The use of the protocol in EC allowed the investigation of secondary metabolites in the crude extract with high specificity and in short analysis time, without the need for previous sample treatment.

Key words: *Ptychopetalum olacoides*, Marapuama, Capillary Electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography, Methylxanthines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas de Marapuama.....	13
Figura 2. Ciclo Biossintético dos Metabólitos Secundários.....	16
Figura 3. Estrutura moléculas.....	17
Figura 4. Esquema do equipamento de Eletroforese Capilar.....	19
Figura 5. Migração dos íons em direção ao cátodo.....	20
Figura 6. Representação esquemática da migração de solutos neutros.....	22
Figura 7. Esquema do cromatógrafo líquido.....	23
Figura 8. Separação em MEKC da mistura dos padrões de metilxantinas.....	29
Figura 9. Extrato bruto de Marapuama.....	30
Figura 10. Identificação de cafeína através da adição de padrão.....	31
Figura 11. Identificação de teobromina através da adição de padrão.....	31
Figura 12. Identificação de teofilina através da adição de padrão.....	32
Figura 13. Espectros de absorção no UV do padrão da cafeína (esquerda) e do pico analisado (direita).....	33

Figura 14. Espectros de absorção no UV do padrão da teobromina (esquerda) e do pico analisado (direita).....	33
Figura 15. Espectros de absorção no UV do padrão de teofilina (esquerda) e do pico analisado(direita).....	34
Figura 16. Separação em HPLC da mistura dos padrões de metilxantinas.....	35
Figura 17. Extrato bruto Marapuama.....	36
Figura 18. Identificação dos padrões no extrato através da adição de padrão.....	37
Figura 19. Espectros de absorção no UV do padrão da cafeína (esquerda) e do pico analisado (direita).....	38
Figura 20. Espectros de absorção no UV do padrão da teobromina (esquerda) e do pico analisado (direita).....	38
Figura 21. Espectros de absorção no UV do padrão da teofilina(esquerda) e do pico analisado (direita).....	39
Figura 22. Curvas de calibração para cafeína, teobromina e teofilina.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Figuras de mérito e concentração da cafeína, teobromina e teofilina no extrato de Marapuama.....	41
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Marapuama	13
2.2 Metabólitos secundários	14
2.3 Eletroforese Capilar (CE).....	18
2.3.1 Fluxo Eletrosmótico (EOF)	20
2.3.2 Mobilidade eletroforética	21
2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	22
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Obtenção da amostra de Marapuama.....	26
4.2 Extração e fracionamento da amostra comercial de Marapuama	26
4.3 Preparo dos padrões	26
4.4 Preparo dos tampões de corrida	26
4.5 Preparo da Fase Móvel	26
4.6 Instrumentação.....	26
4.7 Identificação dos metabólitos	27
4.8 Quantificação dos metabólitos	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	28
5.1 Análise qualitativa por Eletroforese Capilar (CE)	29
5.2 Análise qualitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	34
5.3 Quantificação das metilxantinas em extrato bruto de Marapuama por CE.....	39

5.3.1 Curvas analíticas.....	40
5.4 Comparação entre as técnicas de HPLC e CE na análise das metilxantinas	41
6. CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

A Marapuama é uma planta originária da Amazônia, suas raízes e cascas são popularmente indicadas para vários usos medicinais, sendo o principal o tratamento da impotência sexual. Outros usos são como afrodisíaco, para reumatismo, gripe, anti-inflamatório natural e problemas neuromusculares. (TAYLOR,2003).

Sua composição química ainda não foi completamente explorada, porém estudos já mostraram a presença de ácidos graxos, ésteres, esteroides e xantinas (MONTRUCCHIO,2005). As metilxantinas podem estar envolvidas nas atividades biológicas apresentadas pela planta, por conta de seus efeitos estimulantes sobre o sistema nervoso central e cardiovascular.

A Eletroforese Capilar (CE) ainda não havia sido utilizada para a análise de Marapuama, sendo a primeira vez que ela é empregada. A CE é uma técnica relativamente barata quando comparada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e que também gera menos resíduos ao meio ambiente. Por conta da possibilidade de injeção direta, pode ser considerada uma boa opção no estudo de extratos de plantas, que possuem matriz complexa, não sendo necessário um tratamento prévio da amostra.

Considerando o aumento do uso da Marapuama, a CE surge como uma técnica importante para o estudo e a identificação dos compostos que podem estar envolvidos nas atividades biológicas da planta.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Marapuama

A *Ptychopetalum olacoides* Benth., Olacaceae (Figura 1), é uma espécie originária da Amazônia, popularmente conhecida como Marapuama ou Muirapuama (SILVA,1925). Historicamente todas as partes da planta já foram usadas na medicina tradicional, especialmente as raízes e cascas, que quando obtidas de plantas jovens são empregadas para o tratamento de problemas neuromusculares. Outros usos incluem o tratamento de impotência sexual, como afrodisíaco, para reumatismo, gripe, etc. (SEGOVIA,2001; TAYLOR,2003).

Figura 1: Folhas de Marapuama



Fonte: Puro mais, 2017

O uso tradicional da Marapuama tem sido intensamente explorado ao redor do mundo na fitoterapia. Na Europa seu uso é recomendado para o tratamento de disenteria, impotência e neurastenia; nos Estados Unidos tem ganho popularidade, onde é usada para impotência, depressão, cólicas menstruais e desordens no sistema nervoso. (TAYLOR, 2003). Indústrias de fitoterápicos em diversos países da América e Europa têm explorado a planta ou seus extratos para a produção de fitofármacos na forma de comprimidos, tinturas e suplementos vitamínicos (SILVA et al., 2002; SIQUEIRA et al. 2003, 2007). Ela também é componente do medicamento Catuama® usado em diversas partes do Brasil como tônico para alívio da fadiga física e mental (ANTUNES et al.,2001).

Apesar de todas estas aplicações para a Marapuama, pouco se conhece sobre a fitoquímica da espécie. Alguns estudos realizados mostraram que as raízes e cascas contém óleos essenciais, vários ácidos graxos e seus ésteres, esteroides como sitosterol e lupeol, glutinol, estigmasterol, assim como a presença de ácido palmítico, ácido esteárico e três metilxantinas: cafeína, teobromina e a base adenina. (MONTRUCCHIO, 2005). Algumas pesquisas já realizadas mostraram que as raízes e cascas da *P. olacoides* contém um alcaloide denominado muirapuamina, embora sua estrutura química não tenha sido demonstrada (MONTRUCCHIO, 2002). Resultados sugerem que este alcaloide púrico pode ser na verdade a cafeína, que é o alcaloide púrico mais abundante na planta (MONTRUCCHIO, 2005).

Entre as propriedades atribuídas a Marapuama, verifica-se a atividade antioxidante de seu extrato alcoólico em cérebro de ratos (SIQUEIRA, 2007), além da melhora da capacidade cognitiva, redução do estresse e melhora da performance física e sexual (MENDES e CARLINI, 2007). A planta foi ainda descrita como possuindo atividade anticolinesterase (SIQUEIRA, 2003). O extrato etanólico apresentou atividade contra bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, ambas resistentes a diversas drogas (CORREIA, 2008). Em estudos realizados por Montrucchio e colaboradores em 2005, verificou-se que a cafeína é o principal alcaloide púrico na planta sendo possivelmente um dos responsáveis pela ação estimulante da Marapuama.

2.2 Metabólitos secundários

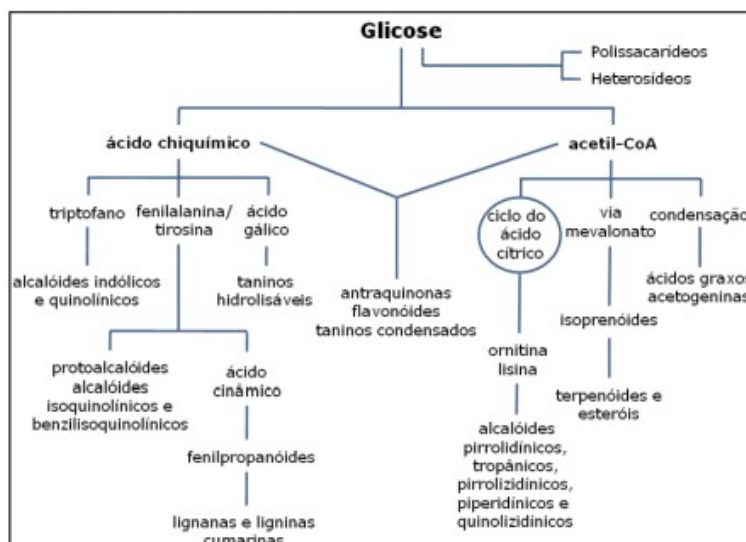
Metabolismo é o conjunto de reações químicas que continuamente ocorrem em cada célula, os compostos químicos formados, degradados ou transformados são chamados metabólitos. Essas reações visam primeiramente o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula, como energia, poder redutor e biossíntese das substâncias essenciais a sua sobrevivência, por serem considerados processos indispensáveis à vida e comuns aos seres vivos, estes compostos foram definidos como integrantes do metabolismo primário (SIMÕES, 2007).

Vegetais, microrganismos e em menor escala, animais são capazes de produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias que não estão necessariamente relacionadas de forma direta com a manutenção da vida do organismo produtor. A este conjunto metabólico dá-se o nome de metabolismo secundário, cujos produtos, embora não sejam necessariamente essenciais garantem vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie no ecossistema, estas rotas metabólicas, não são tão gerais e talvez só sejam ativadas durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse causados por limitações nutricionais ou ataque microbiológico. (MANN,1987).

Muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio. Já foram reconhecidas como funções dessa classe de metabólitos, a defesa contra herbívoros e microrganismos, a proteção contra os raios UV, a atração de polinizadores e animais dispersores de sementes (WINK,1990) e também em alopatias (HARBORNE,1988).

Os metabólitos secundários são divididos em três grandes grupos: compostos fenólicos, alcaloides e terpenóides, sendo que os primeiros englobam flavonoides, cumarinas e ácidos fenólicos. Estima-se que existam mais de duzentos mil metabólitos secundários conhecidos (HARTMANN,2007), apesar dessa grande diversidade, tais substâncias são produzidas a partir de três vias metabólicas principais, como mostrado na Figura 2 (SANTOS,2004).

Figura 2: Ciclo Biossintético dos Metabólitos Secundários.



Fonte: Extraído de SANTOS, 2004.

Os metabólitos secundários frequentemente apresentam atividades biológicas interessantes, muitas de importância comercial na área farmacêutica, alimentícia, agronômica, cosmética entre outras.

- **Alcaloides**

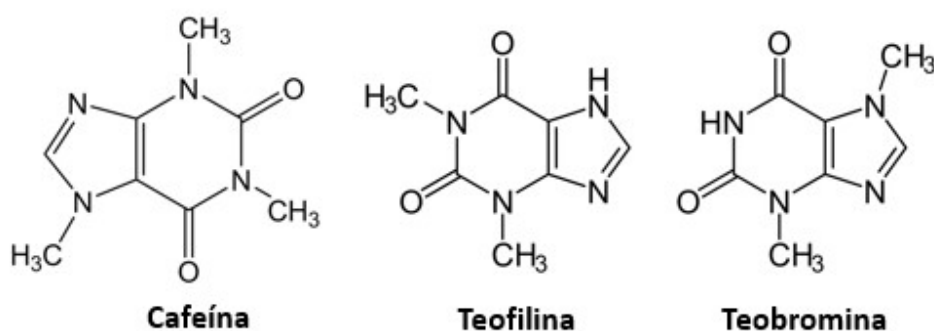
São compostos nitrogenados, farmacologicamente ativos, geralmente derivados de um ou mais aminoácidos, na sua grande maioria possuem caráter básico, com exceção dos sais quaternários de amônio (EVANS, 1996).

A biossíntese de alcaloides pode ocorrer tanto pela via do ácido chiquímico, como pela via do acetato (Figura 2). Além disso, apresentam grande diversidade estrutural, sendo classificados como: alcaloides verdadeiros, contendo o nitrogênio dentro do anel, protoalcaloides, que são aminas simples cujo nitrogênio não se encontra incluído no sistema heterocíclico, os pseudoalcaloides derivados de terpenos ou esteroides e metilxantinas que são derivadas das bases púricas (PELLETIER, 1988).

- Metilxantinas

As metilxantinas são substâncias derivadas das bases púricas, que são compostos nitrogenados heterocíclicos, derivados de nucleotídeos. Devido à sua biossíntese não ser derivada de aminoácidos alguns autores classificam as metilxantinas como pseudo alcaloides, principalmente pela semelhança estrutural e características físico-químicas (MORAES, 2003). As metilxantinas mais abundantes são a cafeína, teofilina e teobromina (Figura 3).

Figura 3: Estrutura das metilxantinas



Fonte: Autor, 2019

As metilxantinas podem ser trimetiladas, como a cafeína, ou bimetiladas, como a teofilina e a teobromina. As trimetilxantinas apresentam caráter básico mais pronunciado que as dimetilxantinas. Da mesma maneira que os alcaloides, as metilxantinas comportam-se como bases fracas. São substâncias solúveis em água, em álcoois e solventes orgânicos clorados, como o clorofórmio (SIMÕES, 2007). Apresentam um amplo espectro de atividades farmacológicas, agem sobre sistema nervoso central, cardiovascular, renal e digestivo, pode agir também sobre o

metabolismo de carboidratos e lipídeos, estimulando a lipólise (SAWYNOK, 1995). Entre estes efeitos pode-se destacar:

- Sobre o sistema nervoso central: são estimulantes, inibem o sono, diminuem a sensação de fadiga, estimulam os centros respiratórios e vasomotores bulbares, existem controvérsias se esta atividade é mais marcante para a cafeína ou teofilina (SIMÕES, 2007).

- Sobre o sistema cardiovascular: possuem ação inotrópica positiva, aumentam a frequência e os débitos cardíacos e coronariano, este feito é mais marcante para a teofilina, já a cafeína causa vasoconstrição do sistema vascular cerebral e vasodilatação periférica (SIMÕES, 2007).

- Sobre a musculatura lisa: a teofilina e de maneira menos acentuada, a teobromina, induzem um relaxamento não específico da musculatura brônquica, das vias biliares e ureteres (SIMÕES, 2007).

- Sobre a diurese: a teobromina e a teofilina aumentam o débito sanguíneo renal e a filtração glomerular, possuindo uma atividade diurética, este efeito é mais duradouro para a teobromina (SIMÕES, 2007).

2.3 Eletroforese Capilar (CE)

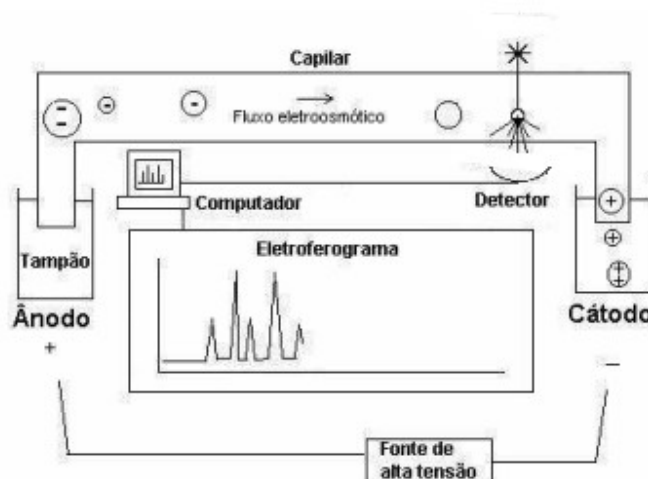
A CE é uma técnica de separação que permite a migração de espécies carregadas eletricamente, dissolvidas ou suspensas em um eletrólito, através da aplicação de um campo elétrico. Ela é empregada na determinação de compostos biológicos, em análises metabólicas, amostras ambientais, etc. (SOARES, 2007).

As análises são rápidas, utiliza-se pequena quantidade de amostra, sistemas tampões aquosos, pequenos volumes de solventes e gera pouco resíduo orgânico. sendo mais adequada aos requisitos da Química Verde (TAVARES, 2010). Além disso, a possibilidade de injeção direta de amostras em matrizes complexas, como extratos de plantas ou plasma sanguíneo, sem necessidade de tratamento prévio, torna possível uma avaliação sistemática de vários componentes em uma única corrida (TAVARES, 2010).

A técnica possui vários modos de operação que incluem a eletroforese capilar em solução livre (FSCE), cromatografia eletrocinéticamicelar (MEKC), focalização isoelétrica capilar (CIEF), eletroforese capilar em gel (CGE) e isotacoforese capilar (CITP), sendo aplicável na determinação de uma grande variedade de compostos, incluindo vitaminas, aminoácidos, íons inorgânicos, ácidos orgânicos, fármacos, substâncias quirais, proteínas e peptídeos (GUZMAN, 1993).

O instrumento para CE é composto por cinco partes: sistema de injeção, sistema de separação (este sistema inclui “*vials*” com o eletrólito de corrida; eletrodos de platina e capilar, comumente constituído de sílica fundida), sistema de detecção, aquisição de dados e fonte de alta tensão (Figura 4). A fonte de alta tensão é conectada aos reservatórios contendo os eletrólitos adequados, por meio dos eletrodos. Os capilares preenchidos com eletrólito ajudam a manter o contato elétrico, funcionando como um canal de migração (TAVARES, 1996). Quando a tensão é aplicada, os íons migram no capilar de acordo com sua mobilidade eletroforética e são separados no fluxo eletroosmótico, sendo detectados pelo detector que é posicionado on-line no capilar (GUZMAN, 1993).

Figura 4: Esquema do equipamento de Eletroforese Capilar



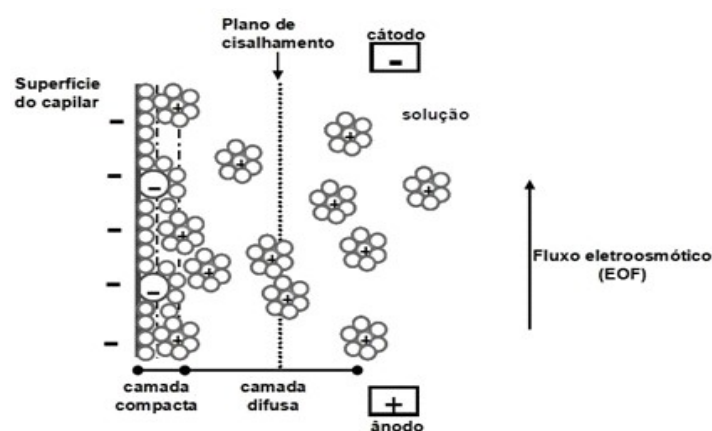
Fonte: Adaptado de HILLEBRAND, 2005

2.3.1 Fluxo Eletrosmótico (EOF)

A superfície interna dos capilares de sílica contém grupos silanóis (SiOH) que se ionizam quando em contato com soluções aquosas, sendo que esta ionização produz uma superfície carregada negativamente; assim o fluxo eletrosmótico decorre da interação da solução com a superfície interna do capilar (Figura 6). Uma camada de cátions é formada próxima à parede do capilar a fim de manter a eletroneutralidade, formando uma dupla camada elétrica com os grupos silanóis ionizados, criando uma diferença de potencial muito próxima à parede; este fenômeno é conhecido como potencial zeta. A aplicação de uma diferença de potencial irá causar a movimentação dos íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Estes, por sua vez, ao se movimentarem, carregam moléculas de água, induzindo o fluxo da solução em direção ao cátodo (MICKE, 2012).

Essa migração resulta no movimento das espécies em direção ao cátodo e pode ser considerado como um fluxo eletricamente dirigido. A magnitude do EOF é altamente dependente do pH do eletrólito, uma vez que o potencial zeta é governado pela ionização dos grupos silanóis (ácidos) da parede do capilar. Abaixo de pH 4, a ionização dos grupos silanóis é pequena e o EOF não é significativo, enquanto acima de pH 9 os silanóis ficam completamente ionizados e, portanto, o EOF é alto. (QUEIROZ e JARDIM, 2001).

Figura 5: Migração dos íons em direção ao cátodo



Fonte: Extraído de SOARES, 2007

2.3.2 Mobilidade eletroforética

Nas análises em CE os íons são separados por sua diferença de mobilidade (μ_e), sendo que este fator é influenciado pelo raio e pela carga do íon e pela viscosidade da solução. Assim, cada espécie analisada terá uma mobilidade eletroforética característica. Ácidos e bases fracas, apresentam os valores de mobilidade efetiva (μ_{ef}) que dependem do seu grau de ionização (α_i) e de sua mobilidade característica (μ_e) (TAVARES, 1996).

$$\begin{array}{ll} \text{I)} & \mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \\ \text{II)} & \mu_{ef} = \alpha_i \cdot \mu_e \end{array}$$

I) Mobilidade característica (μ_e)

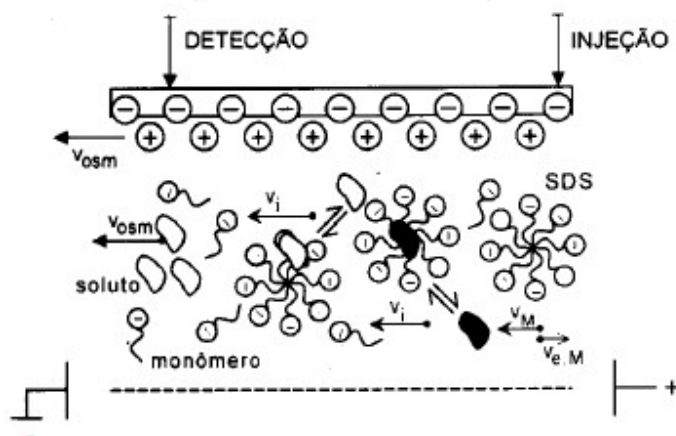
II) Mobilidade efetiva (μ_{ef})

Portanto a análise de pKa dos compostos é um dos parâmetros mais importante em CE, já que a mobilidade do íon é dependente do mesmo. Dessa forma, quanto mais ionizado, maior será a sua mobilidade na eletroforese. Por isso, a escolha certa do pH dos eletrólitos possui um efeito marcante na mobilidade relativa dos íons (WATSON, 1999).

- Eletrocromatografia Micelar (MEKC)

A MEKC foi inicialmente desenvolvida para a separação de compostos neutros. Neste modo de CE, agentes tensoativos em condições apropriadas para a formação de micelas, são adicionados ao eletrólito de corrida, proporcionando assim um sistema cromatográfico de duas fases, onde o eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada eletrosmoticamente sob ação do campo elétrico, enquanto a fase secundária é representada pelas micelas, que é transportada por uma combinação de eletroforese e eletroosmose (Figura 6). Em MEKC diferenças de mobilidade eletroforética podem ser exploradas para separar solutos iônicos, ao mesmo tempo em que, diferenças de distribuição entre a fase micelar e o eletrólito podem ser usadas para separar solutos neutros (TAVARES, 1997).

Figura 6: Representação esquemática da migração de solutos neutros



Fonte: Adaptado de TAVARES, 1997.

Em trabalhos anteriores foram desenvolvidos protocolos utilizando a MEKC para análise de compostos neutros (MORAES, 2003; FRANCO, 2016), empregando tetraborato de sódio (pH 9,3) contendo dodecilsulfato de sódio (SDS), em condições apropriadas para a formação de micelas. Ajustes na concentração do tampão e tensoativo, na injeção, tensão e comprimento de onda de detecção foram otimizados. Estes protocolos foram aplicados para a análise de metilxantinas em extratos de guaraná (MORAES, 2003) e para a análise de cumarinas em sementes de cumaru (FRANCO, 2016), se mostrando altamente seletivos.

2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia é um método físico químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é

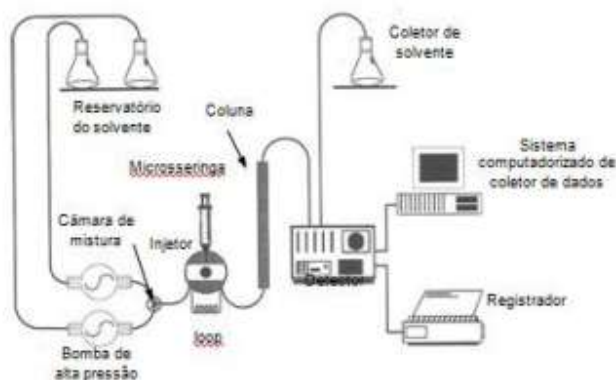
seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS, 2006).

A HPLC é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação. Sua popularidade dá-se por conta de sua sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas, a sua adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, a sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria, para muitos campos da ciência e para o público (SKOOG et al., 2002).

É uma técnica que atualmente utiliza um conjunto de equipamentos especiais. Eles poderão diferir em características e grau de automação, porém, são absolutamente necessários para uma execução conveniente e são chamados de cromatógrafos a líquido (Figura 7). Eles caracterizam-se por terem os seguintes componentes:

- Reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel;
- Sistema de introdução da amostra;
- Sistema analítico – coluna cromatográfica e termóstato das colunas;
- Sistema de detecção (um ou mais detectores);
- Sistema de registo e tratamento de dados (CIOLA, 2000).

Figura 7: Esquema do cromatógrafo líquido



Fonte: Adaptado de ARAÚJO,2004.

A HPLC é comumente utilizada para a separação de componentes em extratos de plantas. A cafeína, teobromina e teofilina já foram analisadas simultaneamente em chás através desta técnica utilizando condições baseadas na ISO 10095 (1992), a fase móvel utilizada foi ácido acético 1% e acetonitrila na proporção 95:5, coluna Inertisil ODS-3 e comprimento de onda de 273 nm, os compostos foram completamente separados em 30 minutos. (ALVES,2002).

Em 2005, Montrucchio e colaboradores analisaram a fração clorofórmica de *Ptychopetalum olacoides* através de HPLC identificando a presença de cafeína, teobromina e adenina (MONTRUCCHIO,2005) utilizando como fase móvel um sistema de acetonitrila, metanol e água em uma coluna purospher RP18. Posteriormente, em 2010, Colombo e colaboradores identificaram a presença de teobromina, ácido protocatecuico e ácido vanílico na planta, empregando uma coluna Luna phenyl-hexyl e como fase móvel acetonitrila: água (contendo 0,1% de ácido acético) no modo gradiente de 5 a 100% durante 40 minutos. Eles quantificaram o ácido vanílico por HPLC, obtendo-se 4,90 mg de ácido vanílico por grama de extrato seco. (COLOMBO, 2010).

A HPLC e a CE tem sido empregadas como técnicas ortogonais. Como é a primeira vez que a CE foi usada para identificar metilxantinas em extratos de Marapuama, estes também foram analisados em HPLC, para que fosse possível fazer uma comparação com a CE, de maneira a confirmar as metilxantinas identificadas por CE no extrato.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal investigar a presença de metilxantinas em extratos brutos de amostra comercial de Marapuama em pó, empregando a Eletroforese Capilar e comparar os resultados obtidos com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

3.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Otimização do protocolo em CE, a fim de estabelecer um perfil eletroforético para as metilxantinas.
- Otimização das condições de separação em HPLC a fim de estabelecer o perfil cromatográfico das metilxantinas
- Quantificar as metilxantinas identificadas no extrato bruto por CE
- Comparar as duas técnicas em termos de rapidez e seletividade

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto foi desenvolvido no laboratório LabInSciences, na UNIFESP *campus* Diadema.

4.1 Obtenção da amostra de Marapuama

A amostra de cascas em pó de Marapuama foram obtidas no comércio local da cidade de Brasília- DF, produzida por Nativa Produtos Alimentícios LTDA, lote 121025.

4.2 Extração e fracionamento da amostra comercial de Marapuama

As extrações foram realizadas por meio de maceração com sonicação durante 30 minutos, empregando como solvente a mistura de metanol e água (40:60), sendo utilizada a proporção de 100 mL de solvente para 5 gramas de amostra. Após este processo, o extrato foi filtrado em papel de filtro qualitativo. Foi utilizado 5 mL deste filtrado para um balão de 10mL que foi completado com o solvente, e então filtrado em filtro Millex 0,22 μm .

4.3 Preparo dos padrões

Os padrões foram preparados em diferentes concentrações utilizando como solvente metanol e água (40:60). A solução estoque foi preparada em 100 mg/L. A concentração de trabalho dos padrões utilizada foi de 20ppm, preparadas a partir da solução-mãe, utilizando água como solvente.

4.4 Preparo dos tampões de corrida

Para a análise em CE, os tampões de corrida foram preparados e armazenados em geladeira. Para a análise de metilxantinas, utilizou-se como eletrólito uma solução tampão de tetraborato de sódio 20 mmol L^{-1} contendo 70 mmol L^{-1} de dodecilssulfato de sódio (SDS), pH 9,3.

4.5 Preparo da Fase Móvel

Para a análise em HPLC a fase móvel utilizada foi acetonitrila solução aquosa de ácido acético 0,1%, na proporção de 13:87, de forma isocrática.

4.6 Instrumentação

Para a análise das amostras foi utilizado um sistema de eletroforese capilar da marca BeckmanCoulter, modelo PA 800 Plus, equipado com detector de arranjo de diodos – DAD/UV-Vis, biblioteca de espectros, termostatizador para amostras, fonte de

alta tensão, computador e software. Foram utilizadas colunas capilares da marca Polymicro Technologies com 75 μm de diâmetro interno e 45 cm de comprimento total. O condicionamento inicial das colunas foi feito com 20 minutos de passagem de NaOH 1M, seguido de 20 minutos de água e 20 minutos do eletrólito de corrida. O condicionamento entre corridas foi feito com 1 minuto de NaOH 1M, 1 minuto de água e 1 minuto de eletrólito de corrida.

Foi utilizado também um cromatógrafo líquido de alta eficiência, UFLC Shimadzu, coluna Phenomenex Kinetex C18 250mm x 4,6mm e 5 μm , um fluxo de 1,0mL/min e injeção de 20 μL .

4.7 Identificação dos metabólitos

Foram utilizados protocolos previamente desenvolvidos em CE para análise de metilxantinas. A identificação de cada um dos compostos em CE foi realizada através comparação do tempo de migração do padrão com o pico na amostra e confirmada através do teste de adição de padrão e pela comparação dos espectros de absorção no UV do padrão e da amostra (SOARES,2007). Por HPLC a identificação ocorreu através da comparação dos tempos de retenção dos picos suspeitos na amostra com os tempos dos padrões de referência, seus espectros também foram comparados e foi feita a adição de padrão para comprovação.

4.8 Quantificação dos metabólitos

A quantificação dos metabólitos secundários identificados foi realizada segundo os parâmetros da RDC166/2017 da ANVISA (BRASIL, 2017) por meio da construção de uma curva de calibração (com no mínimo cinco pontos), sendo que estes foram estabelecidos de acordo com os valores esperados do analito nas amostras. O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) também foram avaliados segundo a RDC 166/2017, sendo que: Limite de detecção (LD): aponta a menor concentração possível do analito em uma amostra ou extrato que pode ser detectado pelo instrumento sob certas condições experimentais. Os limites de detecção foram determinados através da injeção de diferentes concentrações do padrão a ser quantificado, até que se notasse

o desaparecimento do sinal no eletroferograma. Limite de Quantificação (LQ): trata-se da menor concentração do analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As metilxantinas, embora sejam compostos nitrogenados, possuem propriedades distintas quando comparadas aos demais grupos alcaloides que em geral possuem caráter básico e, portanto, são passíveis de protonação em meio ácido, resultando em espécies catiônicas facilmente separáveis por CE em pHs baixos. No pH de trabalho na eletroforese capilar, um pH acima de 9, para que tenha um fluxo eletrosmótico alto, a cafeína encontra-se como uma molécula neutra, assim como a teobromina e a teofilina. Portanto, a separação em CE só é viável em meio micelar, onde ocorre uma interação diferenciada com o interior hidrofóbico das micelas, promovendo sua separação. Por isso esta análise foi realizada pelo modo MECK.

A migração das moléculas de metilxantinas no capilar geralmente ocorre por ação exclusiva do fluxo eletrosmótico, devido sua neutralidade. Assim, não há discriminação espacial/temporal deste soluto na chegada ao detector. A escolha do pH de corrida então recai no controle do fluxo eletrosmótico (TAVARES,1996).

No modo MECK, adiciona-se um agente tensoativo no eletrólito de corrida. A presença do tensoativo permite a formação de micelas, assim a molécula neutra apresentará partição diferenciada entre a composição do tampão, sendo transportada por uma combinação de eletroforese e eletrosmose. Essa partição diferenciada é responsável pela seletividade da separação (TAVARES,1996).

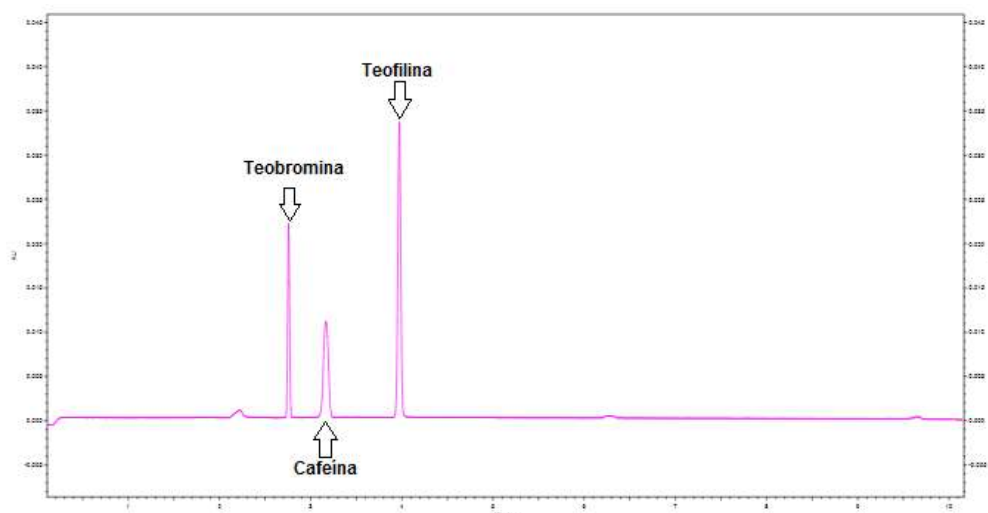
O extrato bruto, obtido em metanol:água (40:60) foi analisado por MEKC utilizando o protocolo para metilxantinas (MORAES, 2003, FRANCO, 2016), que consiste na utilização do tampão de tetraborato de sódio 20 mmol L^{-1} contendo 70 mmol L^{-1} de dodecilssulfato de sódio (SDS) com um pH 9,3 como eletrólito, e voltagem de 20kV. Foram

observados picos correspondentes às metilxantinas de interesse que foram então comparados com padrões de referência para serem identificados e posteriormente quantificados.

5.1 Análise qualitativa por Eletroforese Capilar (CE)

A Figura 8 mostra o eletroferograma de separação dos padrões de cafeína, teobromina e teofilina, empregando o protocolo em CE para metilxantinas. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 274 nm, pois é o comprimento de onda em que há a maior absorção dos compostos (CAMPOS, 2016)

Figura 8: Separação em MEKC da mistura dos padrões de metilxantinas



Condições de análise: Tampão de tetraborato de sódio 20 mmol L^{-1} contendo 70 mmol L^{-1} de dodecilssulfato de sódio (SDS), pH 9,3, tempo de injeção 3s (hidrodinâmica), voltagem 20kV, detecção UV a 274nm. Fonte: Imagem do autor, 2019

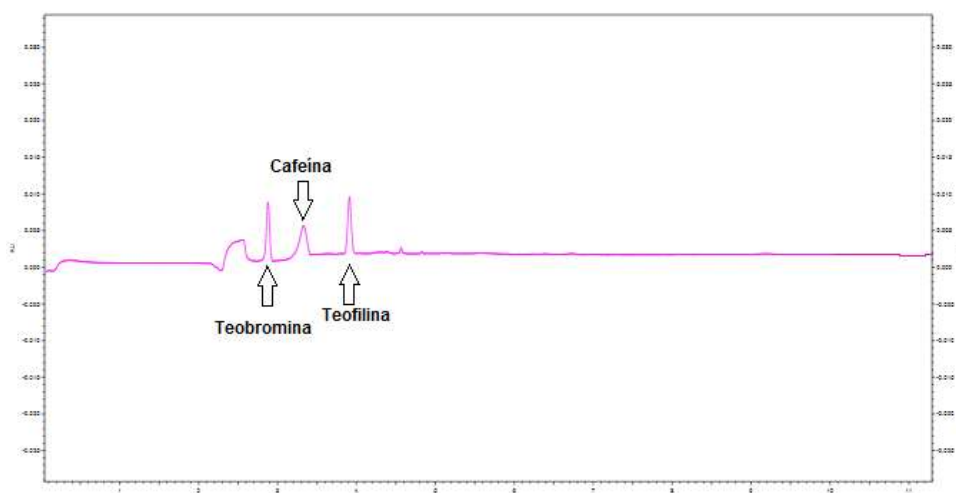
Observou-se que todos os padrões das metilxantinas foram completamente separados na linha de base em menos de 5 minutos. O pH 9,3 foi escolhido devido a presença de EOF, o que torna a análise mais rápida. A identificação de cada pico no eletroferograma da mistura foi feita injetando cada padrão separadamente nas mesmas condições de análise e avaliando os seus tempos de migração e seus espectros

individuais com o mix de padrões. A identificação dos padrões do mix foi feita através da comparação do tempo de migração dos padrões injetados individualmente nas mesmas condições, da adição de padrão e da comparação dos espectros de UV.

Os tempos de migração apresentados em CE para os padrões forma de 3,2 minutos para a cafeína, 3,9 minutos para a teofilina e 2,8 minutos para a teobromina. No extrato de Marapuama os tempos de migração correspondentes foram de 3,5, 3,9 e 2,9 minutos. Apesar da pouca repetibilidade dos tempos de migração devido a variação da corrente elétrica, ainda assim foi possível identificar de forma segura os picos presentes no extrato com os padrões.

A Figura 9 mostra a identificação das metilxantinas no extrato bruto de Marapuama. A identificação foi feita da mesma forma que no mix.

Figura 9: Extrato bruto de Marapuama

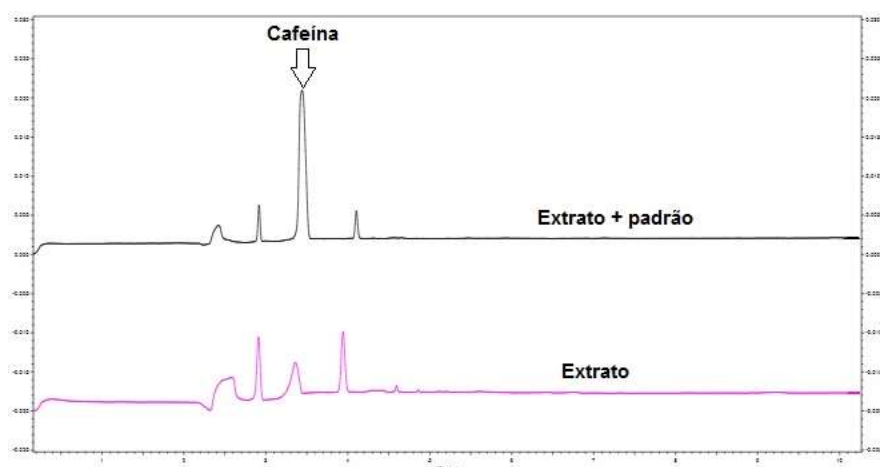


Condições de análise: vide figura 8. Fonte: imagem do autor, 2019.

Adicionou-se uma concentração conhecida do padrão no extrato, avaliando-se todos os picos suspeitos na comparação da mistura(mix) com o extrato. Primeiro foi injetado o extrato e logo após foi injetado o extrato + padrão, sempre nas mesmas condições. Então, foram comparados os eletroferogramas obtidos, avaliando se houve aumento de intensidade no pico investigado (Figura 10-12). A ordem de migração dos

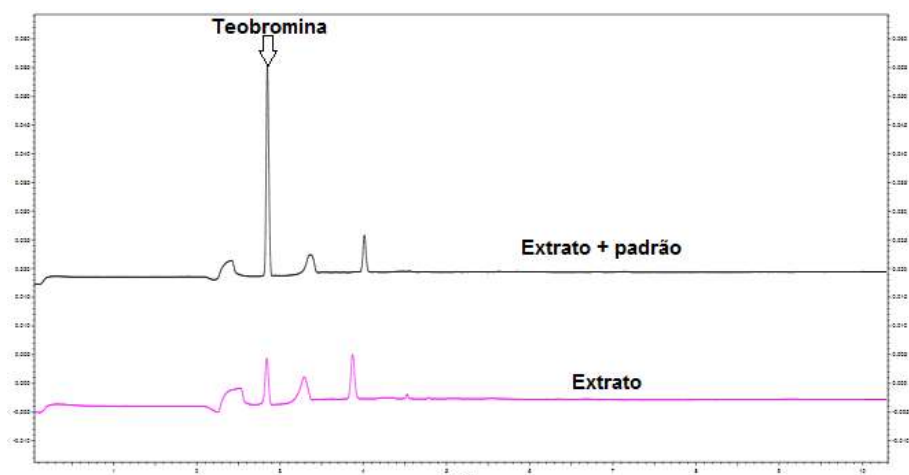
compostos no capilar vai depender da sua interação com as micelas, ocorrendo uma partição diferenciada entre a micela e o tampão. Essa partição diferenciada é responsável pela seletividade da separação, é o que faz com que compostos diferentes possuam tempos diferentes de migração.

Figura 10: Identificação de cafeína através da adição de padrão



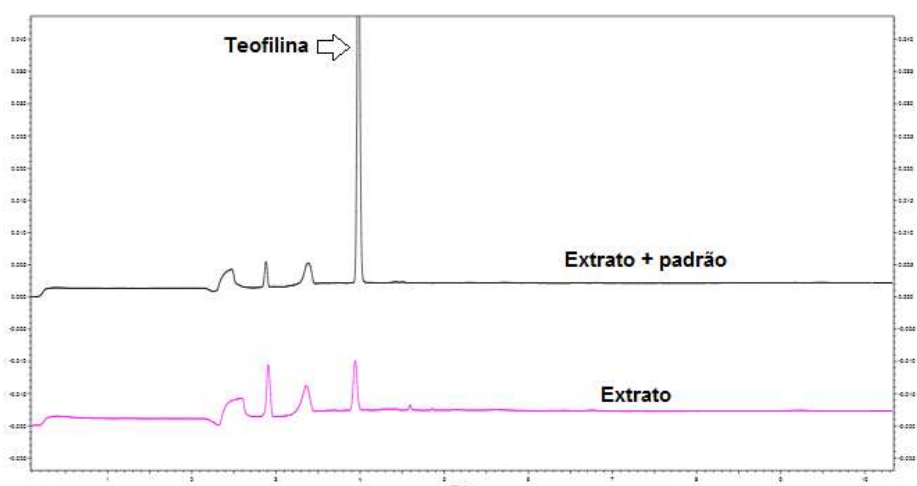
Condições de análise: Vide figura 8. Fonte: Imagem do autor, 2019

Figura 11: Identificação de teobromina através da adição de padrão



Condições de análise: Vide figura 8. Fonte: Imagem do autor, 2019.

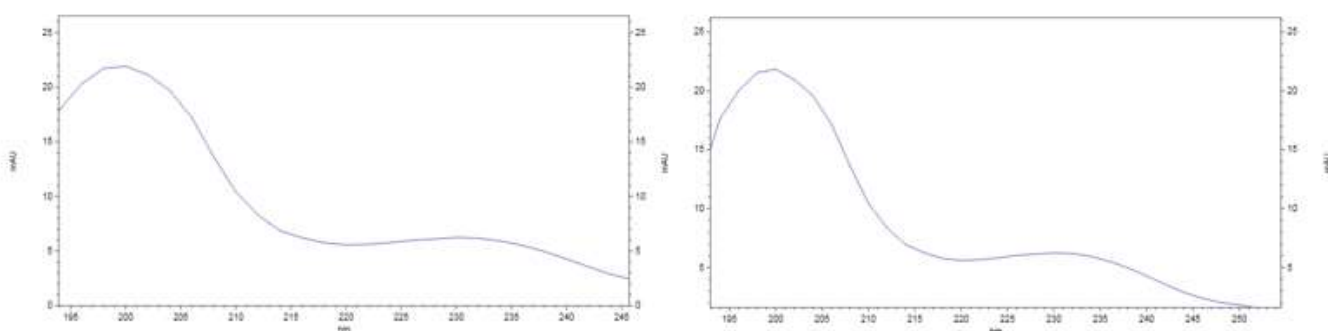
Figura 12: Identificação de teofilina através da adição de padrão



Condições de análise: Vide figura 8. Fonte: Imagem do autor, 2019.

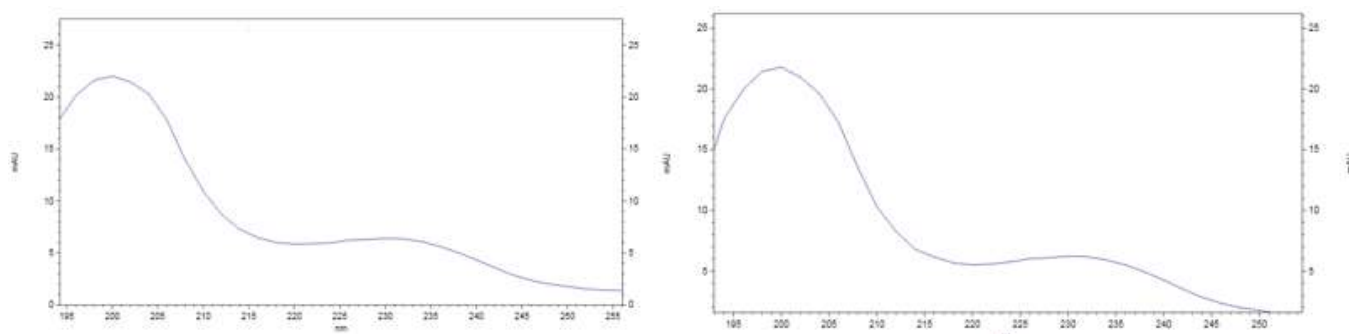
Também foi realizada a comparação dos espectros de absorção no UV dos padrões de cafeína, teobromina e teofilina com os picos suspeitos do extrato. Isto foi possível devido ao uso do detector com fotodiodos (*diode-array* detector, DAD). As figuras 13 a 15 mostram esta comparação.

Figura 13: Espectros de absorção no UV do padrão da cafeína (esquerda) e do pico analisado (direita).



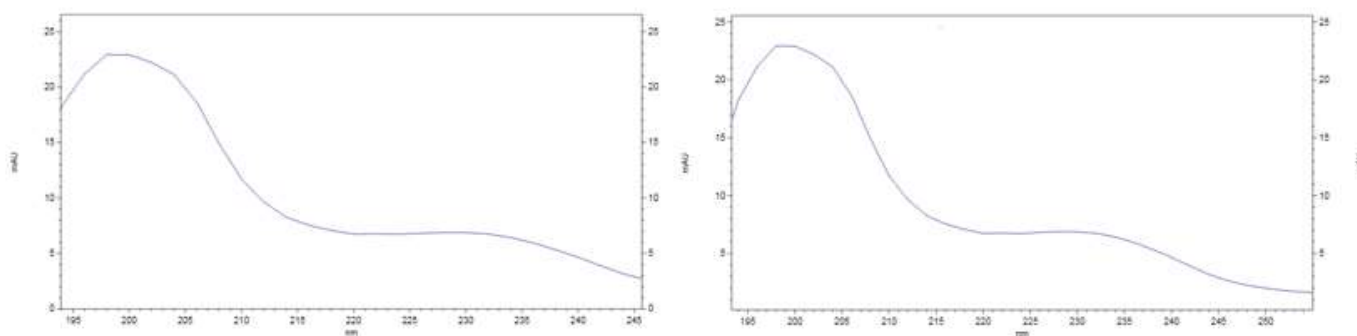
Fonte: Imagem do autor, 2019.

Figura 14: Espectros de absorção no UV do padrão de teobromina (esquerda) e do pico analisado (direita).



Fonte: Imagem do autor, 2019.

Figura 15: Espectros de absorção no UV do padrão de teofilina (esquerda) e do pico analisado (direita).



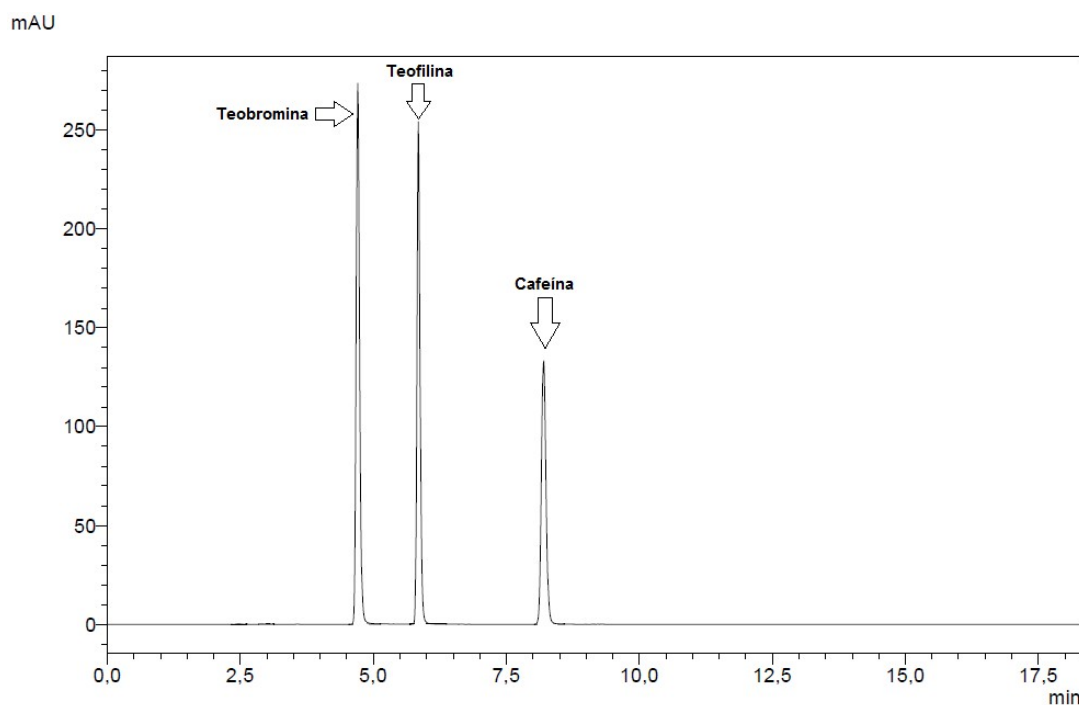
Fonte: Imagem do autor, 2019.

Analisando as figuras, é possível notar que as bandas têm bastante similaridade, apresentando seus picos de absorção em regiões semelhantes. Portanto, pode-se concluir que os picos suspeitos correspondem, respectivamente a cafeína, teobromina e teofilina.

5.2 Análise qualitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Os padrões de cafeína, teobromina e teofilina foram separados utilizando a HPLC (figura 16). As metilxantinas são compostos polares, por isso em HPLC usa-se a fase reversa, onde a fase móvel é polar; por este motivo foi utilizada uma fase móvel contendo ácido acético 0,1% e acetonitrila. Para o desenvolvimento do método foram testados anteriormente uma fase móvel contendo ácido acético 0,1% e acetonitrila na proporção (95:5), com fluxo de 1,0 ml/min e detecção em comprimento de onda de 261nm (não mostrados), porém, estas condições não foram suficientes para uma boa separação e identificação. Novos testes foram realizados e as condições otimizadas foram: coluna C18, com 5µm, um volume de injeção de 20µl, fase móvel ácido acético 0,1% e acetonitrila na proporção (87:13) com um fluxo de 1,0 mL/min. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 274 nm.

Figura 16: Separação em HPLC da mistura dos padrões de metilxantinas



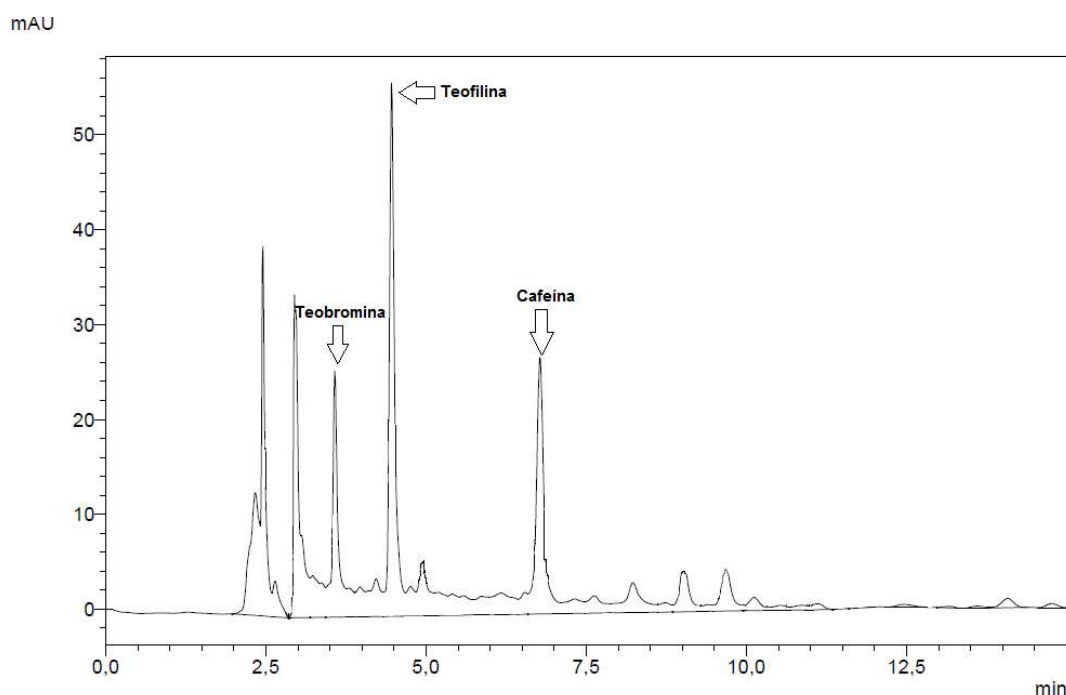
Condições de análise: fase móvel ácido acético 0,1% e acetonitrila na proporção (87:13) com um fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção 20µl, coluna C18 e detecção UV a 273nm. Fonte: Imagem do autor, 2019

Observou-se que todos os padrões de metilxantinas foram completamente separados na linha de base em menos de 8 minutos. A identificação de cada pico no cromatograma do mix foi feita injetando cada padrão separadamente nas mesmas condições de análise e avaliando os seus tempos de retenção. A identificação dos padrões no mix foi feita através da comparação do tempo de retenção dos padrões de referência, injetados individualmente, nas mesmas condições. Seus espectros também foram comparados para a confirmação. A identificação dos mesmos no extrato foi feita observando o tempo de retenção e posteriormente foi realizada a adição de padrão para a confirmação (Figura 20).

Os tempos de retenção apresentados pelos padrões foi de 6,7 minutos para a cafeína, 4,5 minutos para a teofilina e 3,6 para a teobromina. No extrato de Marapuama os tempos de retenção correspondentes foram de 6,7 minutos para a cafeína, 4,5 minutos

para a teofilina e 3,6 para a teobromina. Isto mostra que a técnica possui alta reprodutibilidade podendo ter fácil confirmação dos picos suspeitos no extrato com os picos dos padrões de referência.

Figura 17: Extrato bruto Marapuama



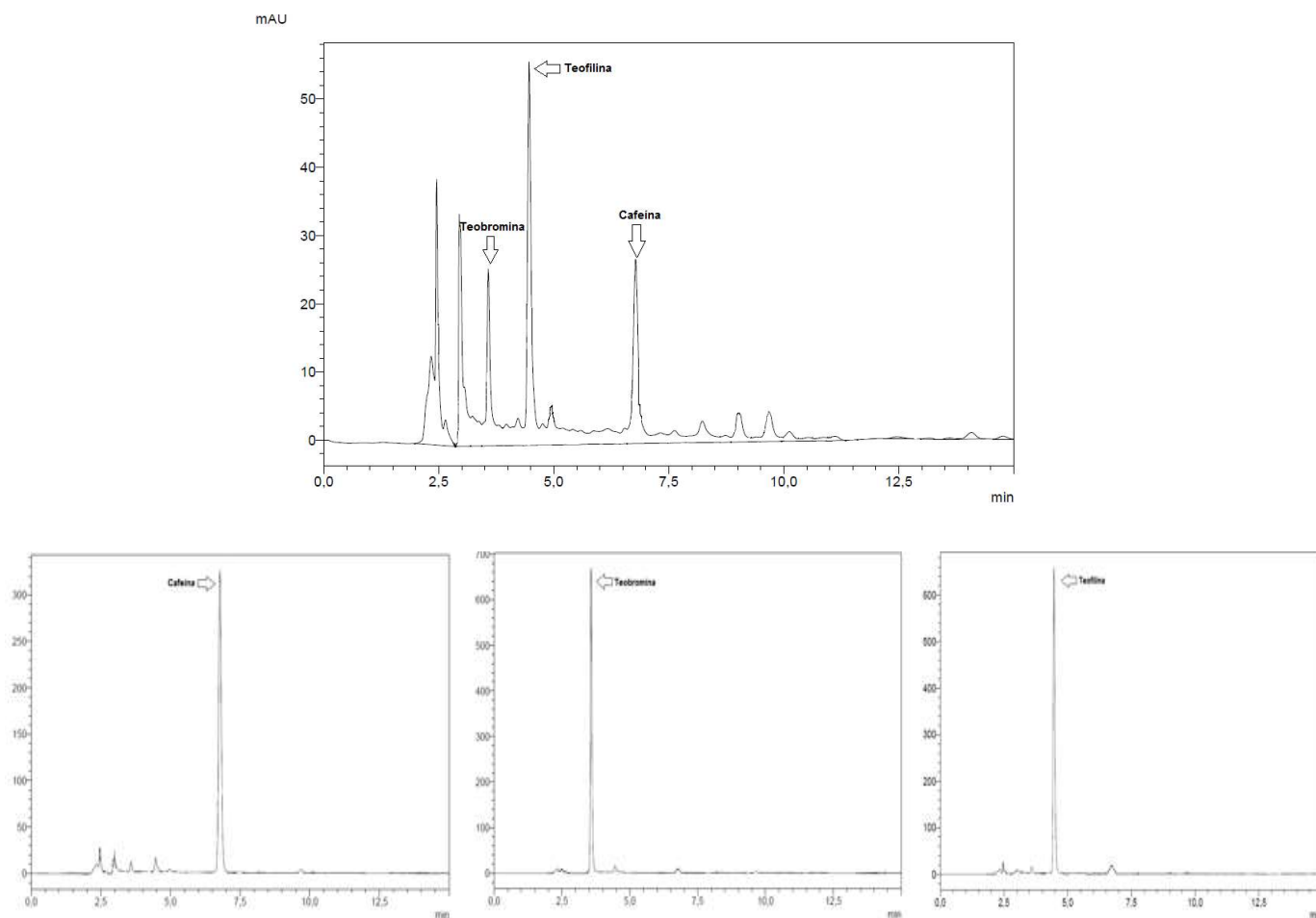
Condições de análise: Vide figura 17. Fonte: Imagem do autor, 2019.

A confirmação dos picos no extrato bruto foi realizada através da comparação dos tempos de retenção, através da comparação dos espectros no UV e através da adição de padrão. A figura 24 mostra a identificação dos padrões no extrato bruto da Marapuama através da adição dos padrões.

A ordem de retenção apresentada é devida a polaridade dos compostos de acordo com sua estrutura química (Figura 3). A cafeína possui apenas um nitrogênio protonável, que em meio levemente ácido já é capaz de elevar sua polaridade, a teofilina e a

teobromina, devido a suas estruturas, são mais polares que a cafeína, isto explica porque a cafeína possui maior tempo de retenção.

Figura 18: Identificação dos padrões no extrato através da adição de padrão

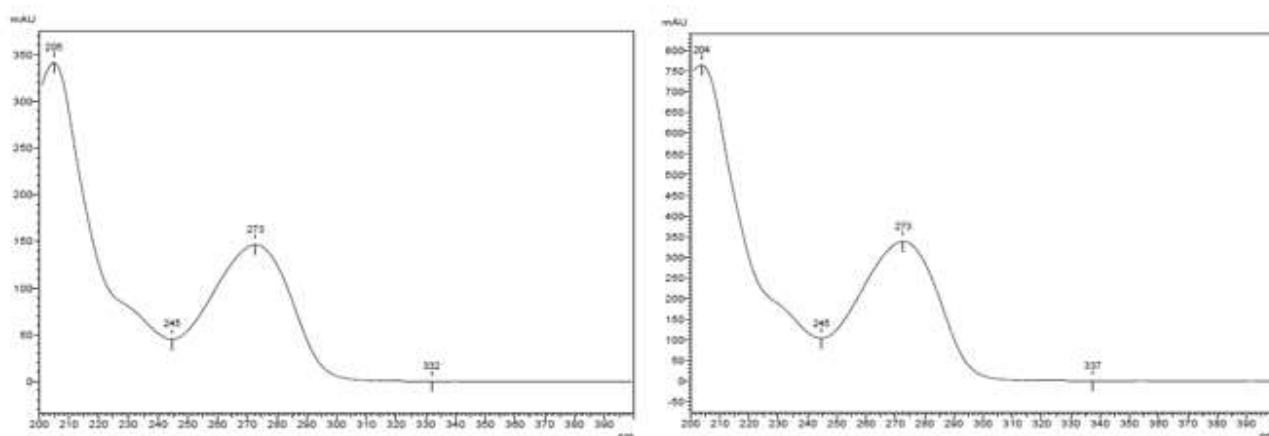


Condições de análise: Vide figura 17. Fonte: Imagem do autor, 2019.

Pode-se observar nas imagens o aumento da intensidade do pico suspeito após a adição do padrão, e assim foi possível confirmar a hipótese de qual pico do extrato corresponde a cada composto analisado.

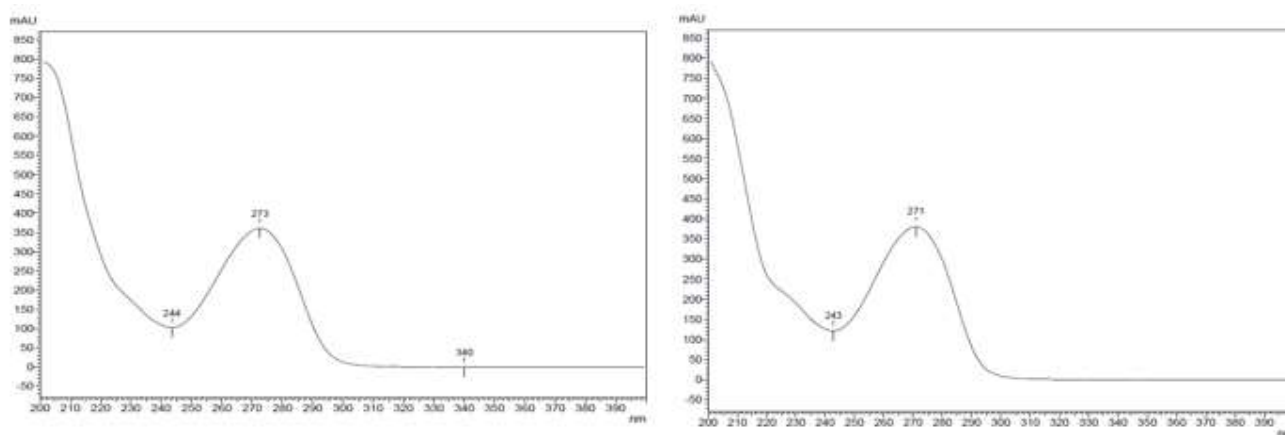
Também foi realizada a comparação dos espectros de absorção no UV dos padrões de cafeína, teobromina e teofilina com os picos suspeitos do extrato. Isto foi possível devido ao uso do detector com fotodiodos (DAD). As figuras 21-23 mostram esta comparação.

Figura 19: Espectros de absorção no UV do padrão da cafeína (esquerda) e do pico analisado (direita).



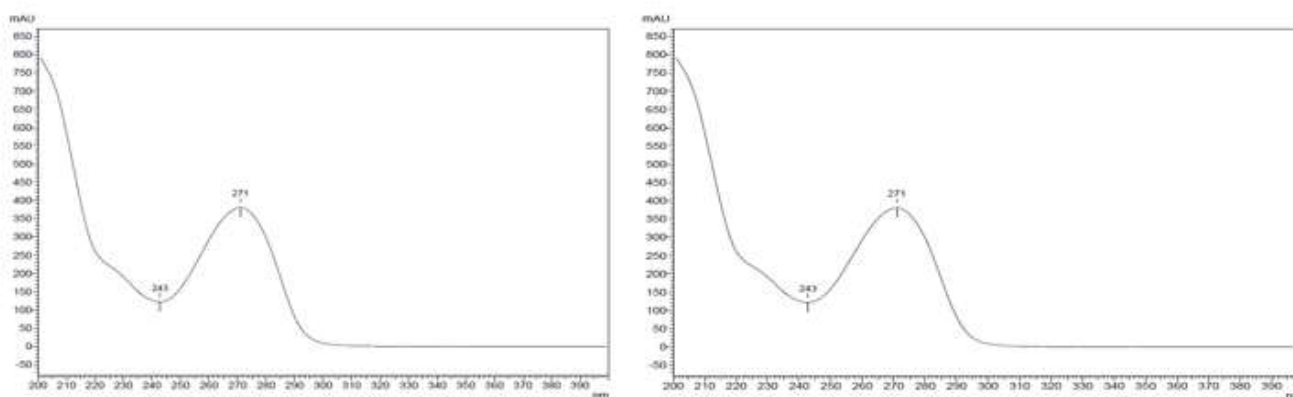
Fonte: Imagem do autor, 2019.

Figura 20: Espectros de absorção no UV do padrão da teobromina (esquerda) e do pico analisado (direita).



Fonte: Imagem do autor, 2019.

Figura 21: Espectros de absorção no UV do padrão da teofilina (esquerda) e do pico analisado (direita).



Fonte: Imagem do autor, 2019.

Analisando as figuras, é possível notar que as bandas têm bastante similaridade, apresentando seus picos de absorção em regiões semelhantes. Portanto, pode-se concluir que os picos suspeitos correspondem, respectivamente a cafeína, teobromina e teofilina.

5.3 Quantificação das metilxantinas em extrato bruto de Marapuama por CE

A quantificação das metilxantinas foi feita por CE no modo MEKC, pois o protocolo foi específico. Apesar de haver outros metabólitos secundários presentes no extrato bruto, foi possível separar, os mesmos não foram visualizados no protocolo das metilxantinas. Com isto conseguimos identificar e quantificar as metilxantinas com alta especificidade.

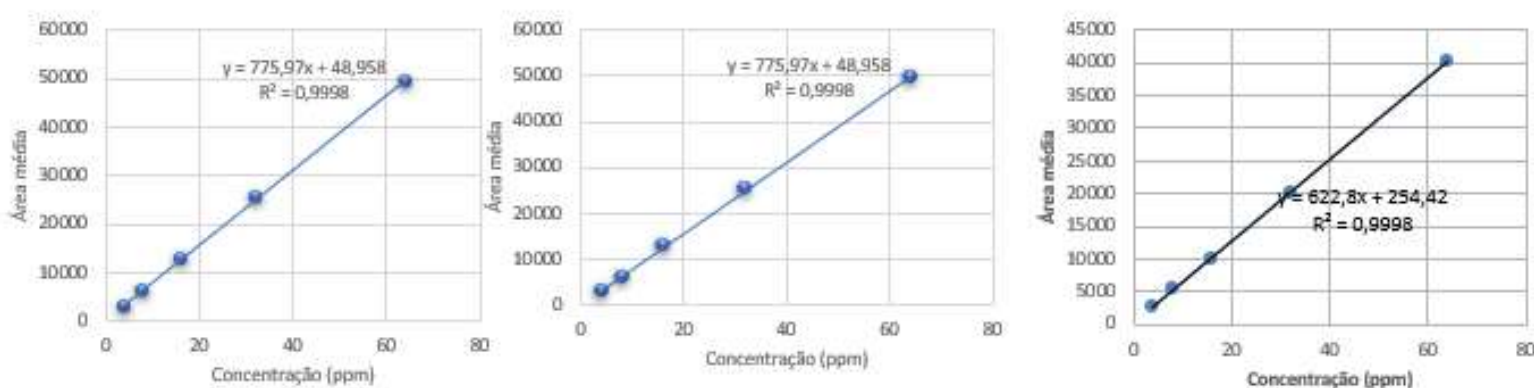
A quantificação das metilxantinas identificadas foi feita segundo os parâmetros da RE 166/2017 da ANVISA (BRASIL, 2017) por meio da construção de uma curva de calibração (com no mínimo cinco pontos), sendo que estes foram estabelecidos de acordo com os valores esperados dos analitos nas amostras. O limite de detecção (LD)

e o limite de quantificação (LQ) também foram avaliados segundo a RE nº: 166 da ANVISA.

5.3.1 Curvas analíticas

Primeiramente foi traçada uma curva de calibração. Os pontos para cada curva de calibração foram obtidos através da injeção de concentrações pequenas de cada padrão até que não se observasse mais sua detecção. As concentrações dos pontos para a curva foram 4, 8, 16, 32 e 64 mg/L. A análise foi realizada em triplicata, utilizando o protocolo definido para metilxantinas. As curvas de calibração da cafeína, teobromina e teofilina são mostradas na Figura 30, respectivamente.

Figura 22: Curvas de calibração para cafeína, teobromina e teofilina



Fonte: Imagem do autor, 2019

As curvas apresentaram boa linearidade nos pontos escolhidos, com R^2 de 0,9998. Foram calculados os limites de detecção e quantificação da cafeína, teobromina e teofilina bem como sua concentração no extrato bruto da Marapuama. O extrato foi injetado também em triplicata, sendo determinada a área média dos picos, e calculada a sua concentração (Tabela 1).

Tabela 1: Figuras de mérito e concentração da cafeína, teobromina e teofilina no extrato de Marapuama

	Cafeína	Teobromina	Teofilina
Intervalo da curva (mg/L)	4 - 64	4 - 64	4 - 64
Coeficiente de Regressão (R^2)	0,9998	0,9998	0,9998
Concentração (mg/L)	43,56	27,46	39,81
Limite de Detecção - LD (mg/L)	0,13	0,065	0,24
Limite de Quantificação - LQ (mg/L)	0,44	0,22	0,79

5.4 Comparação entre as técnicas de HPLC e CE na análise das metilxantinas

O protocolo em CE apresentou alta seletividade sendo sensível e reprodutível na separação das metilxantinas, fornecendo um método simples e rápido para a identificação e quantificação de cafeína, teobromina e teofilina em extratos brutos de Marapuama, sem a necessidade de tratamentos prévios (Figura 9). A cafeína foi o metabólito majoritário encontrado, com concentração de $43,56 \text{ mgL}^{-1}$, o que corresponde a 0,87% do extrato bruto. O método em HPLC foi menos seletivo que a CE, apresentou mais picos no cromatograma do extrato bruto (Figura 17). A reprodutibilidade em HPLC foi melhor do que em CE, pois a HPLC possui menos interferentes como a corrente elétrica ou a variação de pH e condutividade do tampão. O HPLC mostrou também ser mais sensível, conseguindo detectar compostos desconhecidos em concentrações menores, o que não foi possível através da CE. Em termos de tempo de análise a CE separou os compostos em menor tempo, levando menos de 5 minutos, enquanto o HPLC levou em torno de 8 minutos. A eletroforese capilar leva vantagem quando falamos sobre a geração de resíduos e contaminação do meio ambiente, por necessitar de volumes muito pequenos de amostra e tampão e não gerar resíduos de solventes orgânicos é

considerada uma técnica muito limpa quando comparada com a cromatografia líquida de alta eficiência.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram analisadas metilxantinas em amostra comercial das cascas em pó de Marapuama através utilizando CE e HPLC. A utilização de Eletroforese Capilar para a análise de extrato comercial de Marapuama ainda não havia sido relatada na literatura, e mostrou-se uma técnica seletiva para os compostos avaliados, além de simples e rápida, sendo uma ótima opção para a identificação e quantificação de compostos fitoquímicos em plantas, por possuir também a vantagem de não necessitar de tratamentos prévios para a amostras de matrizes complexas.

Métodos simples e rápidos que permitam a caracterização dos metabolitos secundários são necessários para o controle de qualidade de plantas, especialmente devido a variação destes com a sazonalidade, dentre outros fatores. A investigação destes compostos em Marapuama é necessária, uma vez que eles podem contribuir para a atividade biológica decorrente do uso desta planta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A.B., BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. Revista brasileira de ciências farmacêuticas vol. 30, n.2, 2002.

ANDRADE, J.B., PINHEIRO, H.L.C., LOPES, W.A., MARTINS, S., AMORIM, A.M.M., BRANDÃO, A.M. Determinação de cafeína em bebidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Química Nova, 1995.

ANTUNES E, GORDO WM, OLIVEIRA JF, HYSLOP S, NUCCI G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama and its constituents. *Phytother Res* 15: 416-421, 2001.

ARAÚJO, Julio M. A. Química de Alimentos: teoria e prática. 3ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2004, p.416.

CAMPOS, O.S. Estudo da oxidação eletroquímica da cafeína utilizando eletrodo de carbono vítreo. Universidade de São Paulo, Instituto de Química, 2016.

CIOLA, R. Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho. 1ªed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, p.179, 2000.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas: Editora Unicamp. p.453,2006.

COLLINS, C.H. Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. *Química Nova*, São Paulo, 2006, v.29, n.4, p.889-890,2006.

COLOMBO, R. et. al. Validated high-performance liquid chromatographic method for the standardization of *Ptychopetalum olacoides* Benth., Olacaceae, comercial extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20(5): 781-788, Out. /Nov. 2010.

CORBO, M. R. et. al. Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*, 20 October 2014.

CORREIA AF; SEGOVIA JFO; GONÇALVES MCA; OLIVEIRA VL; SILVEIRA D; CARVALHO JCT; KANZAKI LIB. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. *European Review for medical and Pharmacological Sciences* 12: 369-380, 2008.

DELBONE, C.A.C., LANDO, R.L., Importância Ecológica e Evolutiva dos Principais Grupos de Metabólitos Secundários nas espécies vegetais, In: X Congresso de Educação

do Norte Pioneiro, Jacarezinho, UENP- Universidade Estadual do Norte do Paraná. p. 396-404, 2010.

EVANS, W. C. Trease and Evan's Pharmacognosy, 14 ed. London: W B Saunders, 1996. 612 p

FRANCO, T.C. Fingerprint de metabólitos secundários em sementes de Cumaru (Dipteryxodorata) (AUBL.) WILLD. (FABACEAE), 2016.

FRAZIER, A.R. et al. Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. Journal of Chromatography A, 876 (2000) 213–220, 2000.

GOBBO-NETO L.; LOPES N.P., Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários, Química Nova, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GUZMAN, N.A.; Capillary Electrophoresis Technology. Marcel Dekker, New York, 1993.

HARBORNE JB. Introduction to ecological biochemistry. 3ed. London: Academic, 1988.

HARTMANN T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phitochemistry, 2007.

HILLEBRAND, S.; Estudos do Reconhecimento Biomolecular por Eletroforese Capilar. Dissertação, USP, São Carlos, 2005.

JAGER A. V.; TAVARES M. F. Determinação Simultânea De Cátions Por Eletroforese Capilar: Fundamentos e Aplicações Quím. Nova v.24, n.3, 2001.

MANN, J. Secondary metabolism. 2ed. Oxford: Clarendon, 1987.

MARTINS, M.C.T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; MORGANO, M. A. e RODRIGUES, M. I. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e

flavonas por CLAE em pólen apícola utilizando-se Análise de Superfície de Resposta. Rev. Inst. Adolfo Lutz. v.70, n.2, p. 122-131, 2011.

MENDES FR; CARLINI EA. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. Journal of Ethnopharmacology 109: 493-500, 2007.

MICKE, G. A.; SPUDEIT, D.A.; DOLZAN, M.D. Conceitos Básicos em Eletroforese Capilar. Rev. Scientia Chromatographica,4, 287-297, 2012.

MONTRUCCHIO DP; MIGUEL OG. Phytochemical Study and Antimicrobial Activity of *Ptychopetalum olacoides* Benth. Visão Acadêmica, 2002.

MONTRUCCHIO DP; MIGUEL OG; MIGUEL MD; MONACHE FD; CARVALHO JLS. Chemical compounds and antimicrobial activity of *Ptychopetalum olacoides* Benth. Visão Acadêmica 6:48-52, 2005.

MORAES, M.L.L.; MICKE, G.A.; FUJIYA, N.M.; TAVARES, M.F.M. Revista Analytica, 2003.

PELLETIER, S.W. ed. (1983-1988) Alkaloids Chemical and Biological Perspectives, Vol 1-6, New York, USA, Willey.

PEREIRA, J.; SOUTO, E.; MORAES, M. L. L. Screening of phenolic compounds from crude extracts of *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) by capillary electrophoresis, Planta Medica, n.80, 2014.

PEREIRA, J. et al. Screening of phenolic compounds from crude extracts of *Caseariasylvestris* Swartz (Salicaceae) by capillary electrophoresis. Planta Medica 80, 2014.

PURO MAIS. Puro mais, c2019.Benefícios da Marapuama. Disponível em: <<https://puromais.com.br/beneficios-da-marapuama/>>. Acesso em 17 de nov. de 2019.

QUEIROZ, S. C. N.; JARDIM I. C. S. F. Eletroforese Capilar. Chemkeys, p. 1-9, 2001.

QUEIROZ, S.C.; JARDIM, I.C. Eletroforese Capilar. Chemkeys liberdade para aprender, 2001.

RIBANI, M. et. al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quim. Nova, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

RIBEIRO, R. C.; DE CARVALHO, M. G.; DE MORAES, M. L. L.; ROSSIELLO, R. O. P.; DE OLIVEIRA, D. R.; DE AMORIM, R. M. Q.; BARBIERI JUNIOR, E. Chemical Screening of Urochloa humidicola: Methods for Characterizing Secondary Metabolites and Allelopathic Activity on Forage Legumes. American Journal of Plant Sciences, v. 09, p. 1260-1278, 2018.

ROLIM, A. et. al. Total flavonoids quantification from O/W emulsion with extract of Brazilian plants. International Journal of Pharmaceutics 308 (2006) 107–114.

SANTOS, S.; MORAES, M. L. L.; REZENDE, M. O. O. Allelopathic potential and systematic evaluation of secondary compounds in extracts from roots of *Canavalia ensiformis* by capillary electrophoresis. Eclética Química. v.32, p.13-18, 2011.

SANTOS, S.; MORAES, M.L.L.; REZENDE, M.O.O.; SOUZA-FILHO, A. P. S.; Potencial alelopático e identificação de compostos secundários em extratos de calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) utilizando eletroforese capilar, Eclética Química 36 v.2, 51-68, 2011.

SANTOS, S.; MORAES, M.L.L.; REZENDE, M.O.O.; SOUZA-FILHO, A. P. S.; Allelopathic Potential and Systematic Evaluation of Organic Extracts from *Canavalia ensiformis* Leaves (Jack Beans), Journal of Environmental Science and Health, Part B v.40 n.1, p.77-78, 2005.

SANTOS, R.I. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.P.C; MENTZ, L. A.; PETROVIK, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. Metabolismo

básico e origem dos metabólitos secundários. Editora: UFSC, Porto Alegre, 403 – 434, 2004.

SAWYNOK, J. et. al. Caffeine antinociception in the rat hot-plate and formalina tests and locomotor stimulation: involvement of noradrenergic mechanisms. Elsevier Science B.V. (1995).

SEGOVIA, J.F.O. et. al. A Muirapuama (*Ptychopetalum olacoides*) Sob Risco de Extinção. III Sirgealc- Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe, 2001.

SILVA AL; BARDINI S; NUNES DS; ELISABETSKY E. Anxiogenic properties of *Ptychopetalum olacoides* Benth. (Marapuama). Phytother Res 16: 223-236, 2002.

SILVA RAD. Rev Bras. Med. Pharm 1:37. 1925.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.D.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, p.520-533 e 578-609, 2007.

SIQUEIRA IR; FOCESATTO C; SILVA SL, NUNES DS, BATTASTINI AM, ELISABETSY E, NETTO CA. *Ptychopetalum olacoides*, a tradicional Amazonian nervetonic, possesses anticholinesterase activity. PharmacolBiochem Be 75: 645-650, 2003.

SIQUEIRA IR; FOCESATTO C; SILVA SL, NUNES DS, BATTASTINI AM, ELISABETSY E, NETTO CA. Antioxidant activities of *Ptychopetalum olacoides*("muirapuama") in mice brain. Phytomedicine 14: 763-769, 2007.

SIQUEIRA, I.R. et. al. *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian "nerve tonic". Possesses anticholinesterase activity. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 75 (2003) 645-650.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. e NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. 5 eds. Porto Alegre: Bookman (SBQ), p. 598-676, 2002.

SOARES, O.D. Aplicação da eletroforese capilar para análise de nitrito e nitrato em ambientes aquáticos: teoria e prática. Dissertação, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

TAVARES, M.F.M. Determinação quantitativa de gemifloxacino por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. Dissertação, USP, São Paulo, 2010.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese Capilar: conceitos básicos, Química Nova, 173-181, 1996.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar, Química Nova, 1997.

TAYLOR L; Herbal secrets of the Rainforest, 2nd edition, Sage Press, 2003.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.16 (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316), 2010.

WATSON, D. Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemist. Toronto, 1999.

WINK M; CHARLWOOD BV; RHODES MJC. Physiology of secondary product formation in plants. Secondary products from plant tissue culture. Oxford: Clarendon, 1990.

WINK, M.; SAUERWEIN, M. On the role of opines in plants transformed with *Agrobacterium rhizogenes*: Tropane alkaloid metabolism, insect-toxicity and allelopathic properties. J. Plant Physiol. Vol. 142. pp. 446-451 (1993).